

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи

ТОЙМЕНЦЕВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**РАСШИФРОВКА МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ
СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ БАЦИЛЛ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук,
профессор кафедры микробиологии и вирусологии
факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО
"Казанская государственная академия ветеринарной
медицины имени Н.Э. Баумана"
Госманов Рауис Госманович

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
молекулярных основ патогенеза ФГБУН "Казанский
институт биохимии и биофизики" Казанского
научного центра РАН
Давыдова Марина Николаевна

Ведущая организация: Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «27» декабря 2012 г. в _____ ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

Факс: 8(843)238-71-21, 233-78-40. E-mail: TojmencevaAA@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « » ноября 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д. б. н,



З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. Секретируемые белки составляют до 50% от общего количества белковых компонентов клеток бацилл. Многие из них участвуют в гидролизе природных полипептидов и синтезируются в ответ на изменения в окружающей среде. Среди них особое внимание привлекают протеиназы. Эти ферменты вовлечены в важнейшие физиологические процессы клетки, например, участвуют в катаболизме субстратов, споруляции, расщеплении и круговороте белков. Бактериальные протеиназы широко используются в пищевой промышленности, для производства моющих средств и имеют большой потенциал применения в качестве фармакологических препаратов, например, для лечения расстройств пищеварения или болезней сердечнососудистой системы [Gupta R., et al., 2002]. Как правило, в качестве продуцентов протеиназ используются различные штаммы бацилл. Однако, наличие комплекса внеклеточных протеиназ у бацилл создает большую проблему в генной инженерии и биотехнологии, поскольку снижает накопление гетерологичных белков в культуральной жидкости продуцентов [Westers L., et al., 2004]. Решение этой проблемы требует создания новых штаммов-продуцентов и экспрессионных систем, основанных на индуцибельных бациллярных промоторах.

Одной из наиболее интересных групп протеолитических ферментов является класс сериновых протеиназ. Они обнаружены у прионов, бактерий, вирусов, простейших и высших эукариот [Rawlings N.D., et al., 2012]. Сериновые протеиназы эукариот участвуют во многих процессах, в том числе, в эмбриогенезе и развитии патологических состояний. В связи с этим, исследование прокариотических аналогов этих ферментов является удобной моделью при разработке новых лекарственных средств для борьбы с заболеваниями человека. Расшифровка механизмов регуляции генов прокариотических сериновых протеиназ может стать основой для новой стратегии получения гетерологичных белков и создания высокоэффективных систем их экспрессии, что является актуальным направлением современной молекулярной биотехнологии.

Несмотря на объём знаний, накопленных о сериновых протеиназах бацилл, функция этих ферментов в клетке и механизмы их регуляции изучены недостаточно. Для выяснения физиологической функции белка часто используют метод направленной инактивации гена. Штаммы с инактивированными генами протеиназ служат для получения гетерологичных белков, поскольку инактивация внеклеточных ферментов позволяет достичь выхода продукта в количествах, необходимых для применения в биотехнологии. Для разработки эффективных рекомбинантных штаммов и новых систем экспрессии необходимы знания о механизмах регуляции генов. Анализ регуляторных областей, выяснение промоторной специфичности и расшифровка механизмов экспрессии генов является основой клонирования генов в составе экспрессионных систем.

Целью работы являлись расшифровка механизмов регуляции генов сериновых протеиназ бацилл, выяснение роли этих белков в физиологии микробной клетки и разработка системы экспрессии для клонирования их генов. Основные **задачи** исследования:

1. Определить длину регуляторной области генов субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus*;
2. Определить влияние транскрипционных факторов (Spo0A, DegU, SigD, плейотропных репрессоров) на функционирование промоторов;
3. Установить роль протеиназ в физиологии бацилл путём инактивации генов сериновых протеиназ;
4. Разработать систему экспрессии для получения гетерологичных белков на основе антибиотико-индуцибельного промотора двухкомпонентной системы LiaRS *Bacillus subtilis*;
5. Оценить эффективность экспрессии репортёрного гена *gfp* и генов сериновых протеиназ в составе новой экспрессионной системы.

Научная новизна. Все результаты, изложенные в диссертационной работе, получены впервые.

1. Впервые изучена зависимость экспрессии генов сериновых протеиназ от длины промоторного региона генов на основе репортёрных fusion-конструкций (P_{aprBp} -*gfp*, P_{gseBp} -*gfp*). Установлены области регуляции генов протеиназ *B. pumilus*, свидетельствующие, что длина промотора обусловлена вкладом фермента в физиологию бацилл.
2. Разработаны новые беспротеазные штаммы *B. pumilus* с инактивированными генами субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. Получены приоритетные данные, свидетельствующие, что инактивация генов протеиназ привела к изменениям в клеточной морфологии, ускорению лизиса клеток, частичному изменению в способности разлагать углеводы и изменению уровня секреции других гидролаз.
3. Разработана новая эффективная система экспрессии генов на основе *liaI* промотора *B. subtilis*, который регулируется двухкомпонентной антибиотико-индуцибельной системой LiaRS (LIKE система – от нем. **L**ia-**K**ontrollierte **E**xpression). При клонировании рекомбинантных генов в состав LIKE-системы показано, что в течение 30-60 мин после индукции экспрессия рекомбинантных внутриклеточных генов возрастает в 100-1000 раз. Делеция на хромосоме отдельных элементов *liaIH*-оперона приводит к дополнительному увеличению экспрессии генов. Показано, что эффективная продукция внеклеточных ферментов в составе LIKE системы происходит в течение 4-5 часов после добавления индуктора.

Практическая значимость результатов. Данные о структуре промоторов и контроле экспрессии генов сериновых протеиназ (*aprBp*, *gseBp*) *B. pumilus* 3-19 необходимы при клонировании генов под собственными промоторами, а также могут быть использованы при конструировании новых систем экспрессии на основе модификации промоторов.

Беспротеазные штаммы *B. pumilus*, полученные в работе, могут служить в качестве реципиентов для получения гетерологичных белков, повышения уровня их продукции и качества целевого белка за счет снижения протеолитической деградации. Эти штаммы могут применяться в биотехнологии, генной инженерии и, в частности, быть использованы для получения минорных компонентов спектра внеклеточных протеаз *B. pumilus*.

Впервые разработанная новая LIKE экспрессионная система позволяет получить высокий выход гетерологичных белков в клетках бацилл и может быть использована при получении промышленно важных микробных препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гены гидролаз бацилл имеют различную длину промоторов, которая определяется их функцией в физиологии бактерий.
2. Формирование пула внеклеточных гидролитических ферментов *B. pumilus* зависит от функциональной активности субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы.
3. Новая антибиотико-индуцибельная система экспрессии на основе промотора P_{liaI} *B. subtilis* эффективна для продукции гетерологичных белков, включая протеиназы бацилл.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в соответствии с планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета (№ гос. регистрации 01:02.00 104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ № 09-04-99044-р_офи, Германской службы академических обменов DAAD 2009-2011 гг.: № A/08/75088, № A/09/84065, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009-2013 гг.: ГК № П344, ГК № П406, ГК № П323, ГК № 815, ГК № 1053, ГК № 16.740.11.0741.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на IV Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Казань, РФ, 2009), XIV Международной конференции "Ферменты микроорганизмов в биологии и медицине" посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха (Казань, РФ, 2009), Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии», (Казань, РФ, 2009), 3-й совместной конференции Немецкого общества гигиены и микробиологии (DGHM) и Ассоциации по общей и прикладной микробиологии (VAAM) (Ганновер, Германия, 2009), X Научной конференции молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, РФ, 2011), III Ежегодной Международной научно-практической конференции по биологии студентов, магистрантов и аспирантов Тбилисского государственного университета им. Иванэ Джавахишвили (Тбилиси, Грузия, 2011), Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского)

федерального университета (Казань, РФ, 2011), XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ-2012», МГУ, (Москва, РФ, 2012), XI Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, РФ, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из них 5 статей в центральных отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 2 таблицы, 28 рисунков. Библиография содержит 184 наименований российских и зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Штаммы бактерий, плазмидные вектора и условия культивирования.

В работе использовали штаммы и плазмиды из музея лаборатории Биосинтеза и Биоинженерии Ферментов КФУ: стрептомицинустойчивый штамм *B. pumilus* 3-19, протеазо-дефицитный штамм *B. subtilis* BG2036 (предоставлен проф. Eugenio Ferrarri, Genencor Int. Inc., USA), штамм *B. subtilis* W168 (*trpC2*), вектора pSC9 и pCB22 (для синтеза гена *erm*), p58.21, pUC19, pGEM-T Easy (для создания штаммов, нокаутированных по генам сериновых протеиназ). Использовали штаммы и плазмиды, любезно предоставленные Dr. Prof. T. Mascher (Мюнхенский университет Людвига-Максимилиана, г. Мюнхен, Германия): *B. subtilis* W168 *degU::kan* (TMB124), *B. subtilis* W168 *spo0A::tet* (TMB205), *B. subtilis* W168 *sigD::spec* (TMB225), *B. subtilis* W168 *amyE::pSJ5101 (P_{liaI}-gfp)* (TMB408), *B. subtilis* W168 ΔP_{liaI} -*liaIH* (TMB604), *E. coli* DH5 α (*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44* \square 80 Δ *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169), вектора - pDG1662, pGP380, pSG1151 (для синтеза гена *gfpmut1*), pMAD (для создания штаммов, не содержащих гены *lia* оперона), pGFP*amyE* (для изучения регуляторных участков генов сериновых протеиназ).

Культивирование бактерий проводили на среде LB (%): триптон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 0,5; pH 8.5 [Sambrook et al., 1989], агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара. Среда для трансформации штаммов *B. subtilis* включала солевую основу среды Спицайзена, (Спицайзена I/II) [Anagnostopoulous, Spizizen, 1961]. Идентификационная агаризованная среда для отбора клонов, способных секретировать протеиназу, включала 30% обезжиренного молока и 2% агара. Среда стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин, pH довели перед стерилизацией среды 40%-ным раствором NaOH до значения 8.5. В среду при необходимости добавляли антибиотики в конечных концентрациях (мкг/мл): стрептомицин - 10,

ампициллин - 20, эритромицин – 20, линкомицин – 20, хлорамфеникол - 5, канамицин - 10, тетрациклин - 10, спектиномицин - 100.

Получение рекомбинантных конструкций. Процедуры по получению рекомбинантной плазмидной/хромосомной ДНК проводили в клетках *E. coli*, как описано в [Sambrook et al., 1989]. Праймеры конструировали с помощью программного обеспечения Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) на основании последовательностей промоторов и генов: *aprBp* (AN AY754946.2), *gseBp* (AN Y15136.1) *B. pumilus* 3-19, *liaIHGFSR*-оперона (AN AL009126.3) *B. subtilis* 168. Синтез праймеров и секвенирование проводила фирма «Синтол» (Москва). Для клонирования использовали ферменты фирмы «Сибэнзим» (Москва). Выделение геномной ДНК, рекомбинантной плазмидной ДНК, очистку продуктов ПЦР реакции проводили с помощью наборов реактивов фирмы Fermentas (Латвия). При конструировании репортёрных fusion-конструкций ($P_{aprBp}/P_{gseBp}+gfpmut3$) фрагменты ДНК (промоторы генов *aprBp*, *gseBp* *B. pumilus* 3-19) клонировали в вектор pGFP α myE как описано в работе [Bisicchia P. et al., 2010]. Для изучения влияния транскрипционных факторов на экспрессию генов сериновых протеиназ *B. pumilus*, генные мутации по соответствующим факторам транскрипции совмещали с полученными репортёрными fusion-конструкциями. Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидной ДНК проводили, как описано в работе [Anagnostopoulous et al., 1961].

Конструирование новой LIKE-системы экспрессии и определение активности рекомбинантного промотора P_{liaI} . Для конструирования интегративного и репликативного векторов новой экспрессионной системы в регуляторной области *liaIH*-оперона *B. subtilis* оптимизировали участок рибосом-связывающего сайта. Оптимизированный промотор ($P_{liaI(optSD)}$), полученный с помощью ПЦР реакции, клонировали в векторы pDG1662, pGP380 с образованием плазмид pLIKE-int и pLIKE-гер соответственно. Амплификаты генов *gfpmut1*, *aprBp*, *gseBp* клонировали в полученные экспрессионные векторы. Промотор P_{liaI} индуцировали добавлением в среду антибиотика бацитрацина (30 мкг/мл). Активность промотора ($A=dGFP/dt/OD600$) определяли как описано в работе [Botella E., et al., 2010]. При определении активности рекомбинантного GFP белка, сумма естественной флуоресценции штамма дикого типа (*B. subtilis* 168) вычиталась из суммы флуоресценции штаммов с репортёрными конструкциями ($P_{liaI(optSD)}+gfpmut1$; $P_{aprBp}/P_{gseBp}+gfpmut3$).

Определение протеолитической активности. Общую протеолитическую активность рекомбинантных штаммов определяли по расщеплению азоказеина (Sigma, США) [Charney J. et al., 1947]. Специфическую активность субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы определяли по расщеплению хромогенных субстратов Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Glu-pNa соответственно, по методу [Люблинская Л.А. с соав., 1987]. Активность внеклеточной щелочной рибонуклеазы определяли по кислоторастворимым

продуктам гидролиза РНК [Лещинская И. Б. с соавт., 1980]. Фосфомоноэстеразную активность определяли по расщеплению р-нитрофенилфосфата («Serva», Германия) [Лещинская И. Б. с соавт., 1980].

Секвенирование и геноинформатика. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета Clone Manager 6 version 6.00 (SciEdCentral). Выравнивание последовательностей проводили с помощью on-line программного обеспечения NCBI/BLAST.

Математическая обработка результатов. Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel, путём расчёта среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчёте достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. *In silico* характеристика промоторов генов сериновых протеиназ *B. pumilus*. Поскольку структура и длина регуляторных цис-элементов генов протеиназ *B. pumilus* может значительно различаться, 5'-фланкирующие межгенные регионы генов *aprBp* и *gseBp* анализировали с использованием on-line программы NCBI/BLAST. Выравнивание промоторных областей размером 445 п.о. для гена *aprBp* и 1149 п.о. для гена *gseBp*, соответствующих ранее определенным 5'-межгенным регионам, показало высокую степень гомологии с нуклеотидными последовательностями штамма *B. pumilus* SAFR-032. Небольшая область (58 п.о.) 5'-межгенного региона гена *aprBp* (-445...+1) имела слабую гомологию с последовательностью гена фермента фосфоглицератмутаза (*yhfR*, AN CP000813.1). Напротив, в регуляторном регионе гена *gseBp* (-1149...+1) обнаружили протяжённую последовательность (905 п.о.) с высокой степенью гомологии к гену NADPH-редуктазы (*yrhJ*, AN CP000813.1, 91% гомологии). Полученные результаты on-line выравнивания позволили предположить наличие открытой рамки считывания внутри 5'-межгенного региона гена *gseBp* (в положении -1094...-189 относительно сайта инициации транскрипции гена) (рис. 1).

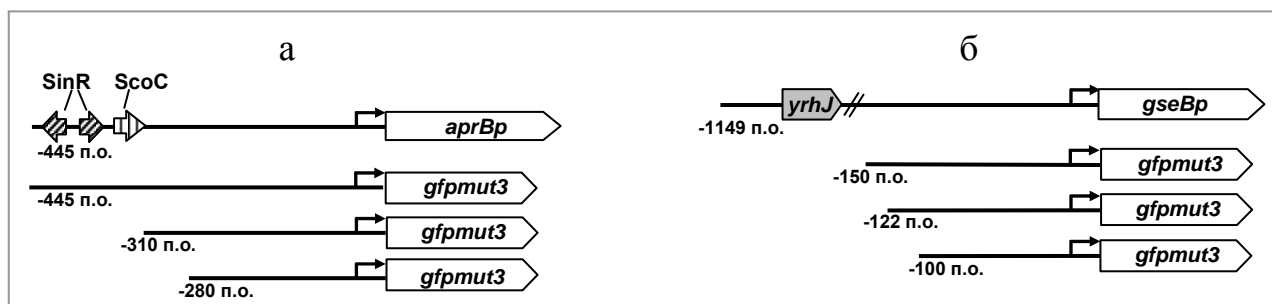


Рис. 1. Создание репортёрных конструкций для определения регуляторных участков генов *aprBp* (а) и *gseBp* (б). Изогнутыми линиями обозначена область начала транскрипции генов. Фрагмент длиной 905 п.о. с 91% гомологией к гену NADPH-редуктазы штамма *B. pumilus* SAFR-032 найденный в 5'-межгенном регионе гена *gseBp* обозначен в виде серого

пятиугольника. Линией обозначены участки 5'-межгенных регионов (потенциальных промоторов), использованные для создания fusion-конструкций.

Определение регуляторного участка (промотора), необходимого для полноценной экспрессии генов сериновых протеиназ. Для определения регуляторного участка генов *aprBp* и *gseBp* сконструировали репортёрные fusion-конструкции на основе гена зелёного флуоресцентного белка GFP и промоторных участков генов протеиназ *B. pumilus* 3-19 разной длины. Три варианта каждого промотора (включающие -445 п.о., -310 п.о., -280 п.о. для гена *aprBp*; -150 п.о., -122 п.о., -100 п.о. – для гена *gseBp*) были транскрипционно соединены с маркёрным геном *gfpmut3* (рис. 1). Динамика роста и накопление флуоресценции полученных конструкций представлены на рисунке 2 A1/B1. Флуоресцентный сигнал появлялся во всех клетках в переходной фазе развития культуры (на 5-8 часы роста). Анализ P_{aprBp} -*gfpmut3* fusion-конструкций показал, что уменьшение 5'-регуляторной области гена субтилизиноподобной протеиназы AprBp (с -445 п.о. до -310 п.о.) приводит к значительному подавлению экспрессии репортёрного гена *gfpmut3* (рис. 2 A1/A2). Укорочение промоторного региона до -280 п.о. относительно сайта инициации транскрипции гена *aprBp* приводило к практически полному ингибированию активности белка GFPMUT3.

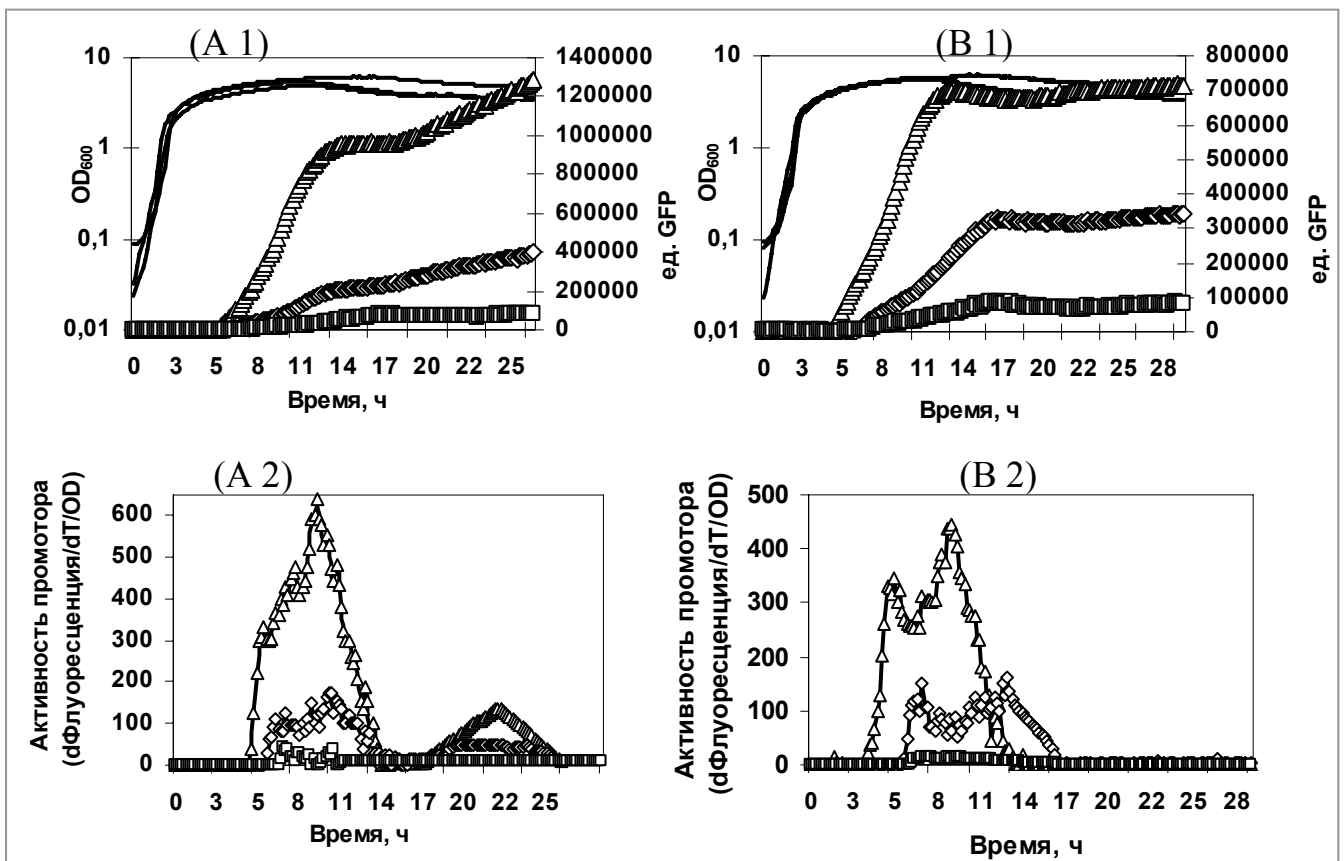


Рис. 2. Динамика роста, накопление флуоресценции (A1, B1) и экспрессия гена *gfpmut3* (A2, B2) в штаммах содержащих fusion-конструкции P_{aprBp} -*gfpmut3* (A1/2), P_{gseBp} -*gfpmut3* (B1/2). Обозначения конструкций: длина промотора субтилизиноподобной протеиназы \triangle - P_{aprBp} 445, \diamond - P_{aprBp} 310, \square - P_{aprBp} 280; длина промотора глутамилэндопептидазы \triangle - P_{gseBp} 150, \diamond - P_{gseBp} 122, \square - P_{gseBp} 100. Рост штаммов обозначен без символов.

Изучение fusion-конструкций с промотором гена глутамилэндопептидазы показало, что при длине регуляторной области (P_{gseBp}) менее 150 п.о. экспрессия репортёрного гена резко снижается (рис. 2 B1/B2).

Таким образом, были определены промоторные участки, необходимые для полноценной экспрессии генов сериновых протеиназ *B. pumilus* 3-19: 150 п.о. для гена глутамилэндопептидазы и 445 п.о. для гена субтилизиноподобной протеиназы.

Экспрессия fusion-конструкций содержащих промоторы сериновых протеиназ в регуляторных мутантах. При лимитации источников питания в клетках почвенных бактерий формируется адаптивный ответ, направленный на выживание. В частности, клетки начинают активно синтезировать различные гидролитические белки (протеазы) [López D., et al., 2010]. Такой процесс обусловлен синтезом в клетке определённых транскрипционных факторов (регуляторов), которые взаимодействуют с отдельными промоторами генов протеаз и активируют их экспрессию. Поэтому, мы исследовали репортёрные fusion-конструкции P_{aprBp} -*gfpmut3* и P_{gseBp} -*gfpmut3*, содержащие промоторы генов *aprBp* и *gseBp* в штаммах дефектных по регуляторным белкам. Показано, что белки DegU и Spo0A оказывают позитивный эффект на активность генов обеих протеиназ, т.к. удаление этих регуляторов подавляет экспрессию в репортёрных конструкциях: делеция гена *degU* – полностью, делеция гена *spo0A* – частично (рис. 3, 4).

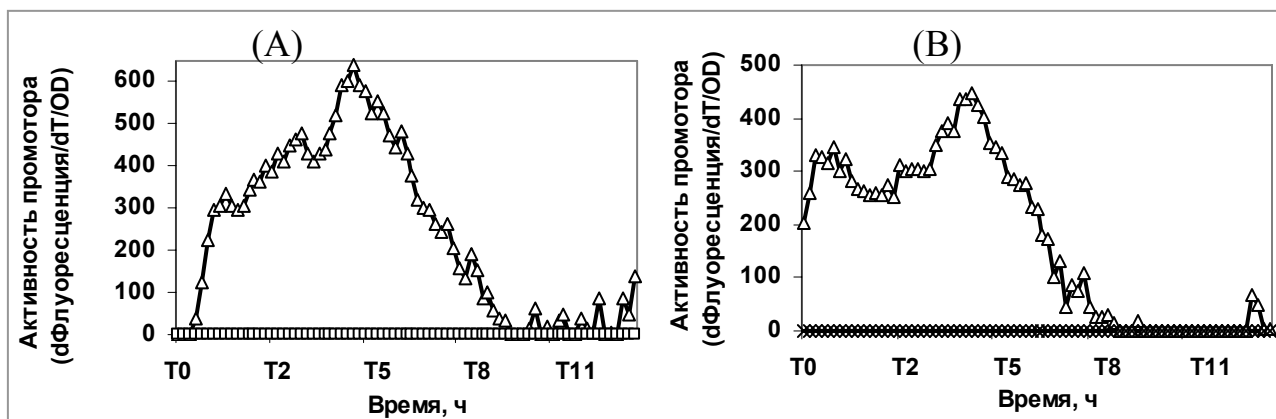


Рис. 3. Экспрессия $P_{445aprBp}$ -*gfpmut3* (A), $P_{150gseBp}$ -*gfpmut3* (B) fusion-конструкций в рекомбинантных штаммах: с дефектом гена регуляторного белка DegU (*degU::kan*) - □; штамм без мутаций - △.

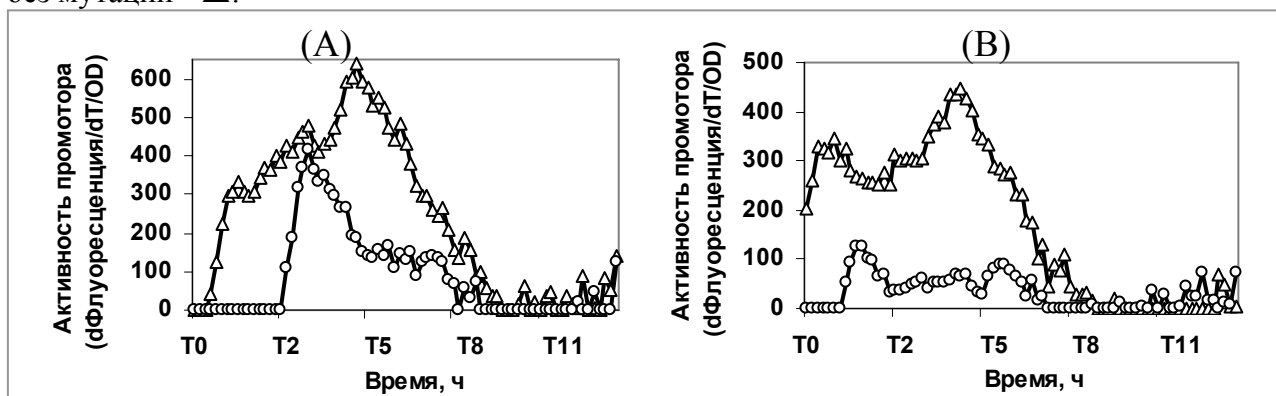


Рис. 4. Экспрессия $P_{445aprBp}\text{-}gfpmut3$ (A), $P_{150gseBp}\text{-}gfpmut3$ (B) fusion-конструкций в рекомбинантном штамме с дефектом гена регуляторного белка Sro0A ($spo0A::tet$) - \circ ; штамм без мутаций - \triangle .

Продукция гидролитических ферментов может конкурировать с другими адаптационными механизмами клетки (например, клеточной подвижностью). В связи с чем изучали экспрессию репортёрных fusion-конструкций $P_{aprBp}\text{-}gfpmu3$, $P_{gseBp}\text{-}gfpmu3$ в мутантном штамме с делецией по регуляторному белку альтернативного сигма фактора - σ^D . Функционирование SigD регулятора обеспечивает в клетках бацилл сборку жгутикового скелета и синтез автолизина. В результате клетки способны к движению и не связаны между собой [West J.T., et al., 2000]. Данные, представленные на рисунке 5 показали, что в мутантном штамме ($sigD::spec$) сильная экспрессия репортёрного гена под контролем промоторов обеих сериновых протеиназ *B. pumilus* начинается в начале переходной фазы.

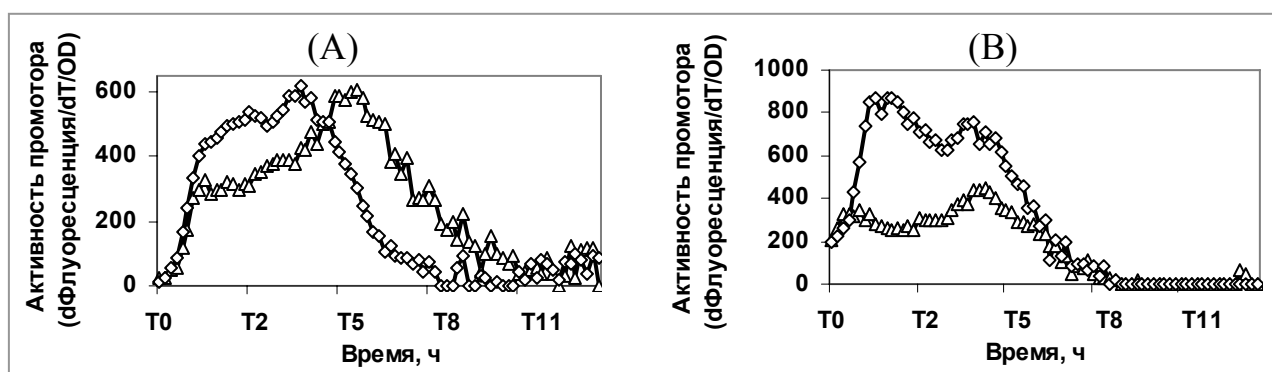


Рис. 5. Экспрессия $P_{445aprBp}\text{-}gfpmut3$ (A), $P_{150gseBp}\text{-}gfpmut3$ (B) fusion-конструкций в рекомбинантном штамме с дефектом гена регуляторного белка SigD - \diamond ; штамм без мутаций - \triangle .

По-видимому, клетки с инактивированным геном альтернативного сигма фактора транскрипции *sigD*, неспособные к экспрессии генов жгутикового оперона, более интенсивно секретируют в среду протеолитические ферменты.

Таким образом, характеристика промотор-специфичности генов сериновых протеиназ *B. pumilus* показала, что обе протеиназы имеют сложный механизм регуляции. Промоторы доминирующей и минорной протеиназ различны по длине и организации: промотор гена доминирующей протеиназы AprBp более протяженный (445 п.о.) и содержит большое количество консенсусных ДНК-сайтов связывания регуляторных белков по сравнению с промотором (150 п.о.) гена минорной протеиназы GseBp. Кроме того, различаются биохимические характеристики и функции данных ферментов *B. pumilus*: доминирующая в протеолитическом пуле протеиназа (70% активности) неспецифически расщепляет пептиды, белковые субстраты, минорная глутамилэндопептидаза (10% активности) гидролизует гидрофильные пептиды по строго заданным сайтам и является узко-специфичным белком.

II. Получение и характеристика штаммов с нокаутированными генами сериновых протеиназ. Для получения штаммов с инактивированными генами использовали подход, основанный на гомологичной рекомбинации между участками экзогенной и геномной ДНК, приводящей к нарушению открытой рамки считывания генов *aprBp* и *gseBp* *B. pumilus*. Были созданы рекомбинирующие конструкции, в которых ген эритромицина (*erm*) встроен в гены сериновых протеиназ. После трансформации полученными конструкциями клеток *B. pumilus* 3-19 проводили отбор мутантов на чашках с эритромицином. Колонии, выросшие на чашках с антибиотиком, тестировали на молочном агаре по уменьшению зон гидролиза казеина вокруг колоний. Выраженные зоны просветления наблюдали у исходного штамма *B. pumilus* 3-19. У модифицированных штаммов зоны протеолиза отсутствовали, что указывало на инактивацию генов секретируемых протеолитических ферментов. Наличие остаточных зон гидролиза соответствует активности оставшихся секретируемых ферментов протеолитического спектра. В результате отобрали рекомбинантные штаммы *B. pumilus* MK10 (*aprBp::erm*) и *B. pumilus* 2A-5 (*gseBp::erm*), которые при тестировании на молочном агаре показали отсутствие протеолитической активности.

Морфология рекомбинантных штаммов (MK10 и 2A-5) по сравнению с диким штаммом (3-19) отличалась: длина клеток MK10 и 2A-5 составляла около 14 мкм (против 8 мкм для дикого штамма); поверхность колоний при росте на агаризованной среде была шероховатая, колонии имели неровные края (по сравнению с более гладкими, ровными краями и слизистыми колониями исходного штамма). На стандартной питательной среде LB показано, что экспоненциальный рост и накопление биомассы для всех трёх штаммов одинаковы. Штаммы одновременно переходили в стационарную фазу, однако склонность к лизису особенно сильно наблюдали у штамма *B. pumilus* 2A-5 (*gseBp::erm*) (рис. 6А). У обоих мутантных штаммов (по сравнению с исходным) нарушено спорообразование: появление свободных спор происходило к 36 часу, а на 45 час их количество составляло ~5% (рис. 6А).

При повышении температуры культивирования до 42°C в обоих штаммах сокращалась продолжительность стационарной фазы и происходил почти одновременный переход к лизису культуры (рис. 6В). Полученные данные свидетельствуют, что инактивация генов внеклеточных субтилиноподобной протеиназы и глутамилэнодопептидазы оказывает эффект на спорообразование и продолжительность стационарной фазы роста. Усиление лизиса клеток у мутантных штаммов, по-видимому, свидетельствует об участии сериновых протеиназ в гидролизе автолизина. Такой процесс описан для клеток *B. subtilis* и нескольких видов стафилококков [Kodama T. et al., 2007; Rice K. et al., 2001; Yokoi K.J. et al., 2012].

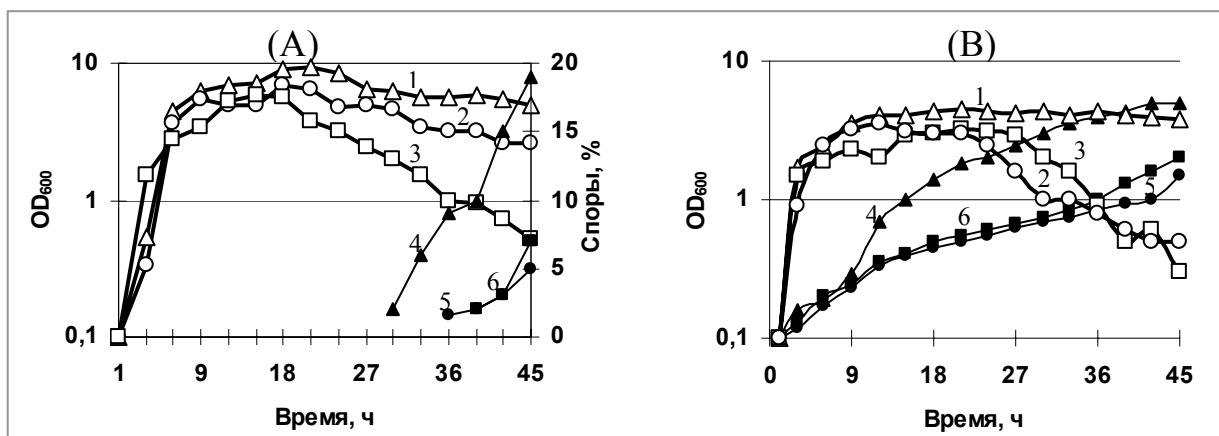


Рис. 6. Динамика роста и спорообразования исследуемых штаммов, выращенных в жидкой среде LB. (А) Рост/спорообразование клеток *B. pumilus*: исходный штамм 3-19 (1/4); нокаутированный по гену *aprBp::erm* МК-10 (2/5), нокаутированный по гену *gseBp::erm* 2А-5 (3/6). (В) Рост клеток при температурах 42°C/15°C: *B. pumilus* 3-19 (1/4); штамм МК-10 (2/5), штамм 2А-5 (3/6).

Характеристика секретируемых гидролаз нокаутированных штаммов.

Известно, что вклад обеих протеиназ, глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы, в общую протеолитическую активность штамма *B. pumilus* 3-19 различен – на *AprBp* протеиназу приходится около 70%, на глутамилэндопептидазу *GseBp* до 10% [Sharipova M.R., et al., 2007; 2008]. Мы наблюдали эффект снижения активности различных протеиназ в клетках, содержащих отдельные мутации по генам сериновых протеиназ *aprBp* и *gseBp*. По уровню общей протеолитической активности на азоказеине модифицированные штаммы МК10 и 2А-5 уступали исходному штамму 3-19 в ~2,5 раза (рис. 7А). У инактивированных штаммов активность на соответствующих нокауту субстратах отсутствовала. При этом, активность в отношении субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA практически отсутствовала у обоих мутантных штаммов (рис. 7В), тогда как в отношении субстрата Z-Glu-pNA активность не выявлялась у мутанта 2А-5 (*gseBp*⁻), но определялась, хотя и на низком уровне у мутанта МК-10 (*aprBp*⁻) (рис. 7С). По-видимому, функционально-активная субтилизиноподобная протеиназа играет важную роль в формировании минорного фермента глутамилэндопептидазы. Глутамилэндопептидаза, в свою очередь, влияет на формирование пула внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы.

Изучение активности РНКазы в штаммах с делециями показало, что инактивация протеазных генов не приводила к изменению её активности (рис. 7D), т.е. созревание фермента не зависит от присутствия субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы. В тоже время инактивация генов обеих сериновых протеиназ приводила к изменению уровня активности внеклеточной фосфатазы. По сравнению с исходным (3-19) штаммом активность фосфатазы в штамме 2А-5 повышалась в 3-6 раз на разных стадиях культивирования клеток (рис. 7Е). Штамм с нокаутированным геном *aprBp* (МК-10) показал менее выраженное увеличение уровня фосфатазы, однако активность фермента была выше в ~2 раза в стационарной фазе по сравнению с исходным

немодифицированным штаммом. Было сделано заключение, что глутамилэндопептидаза может участвовать в созревании фермента фосфогидролазы. В целом, полученные нами данные указывают на сбалансированность содержания протеиназ в общем пуле внеклеточных ферментов и их корегуляцию.

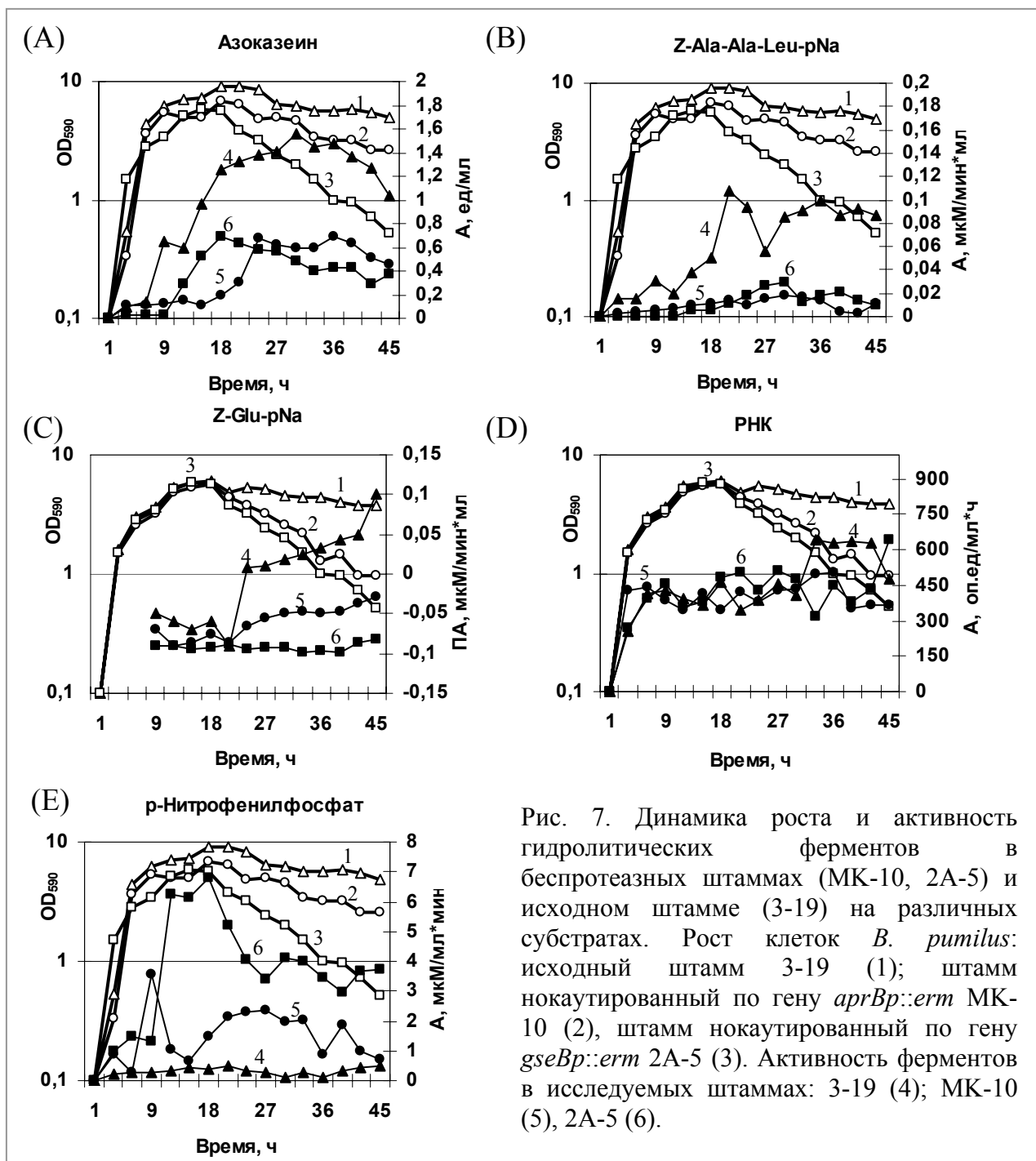


Рис. 7. Динамика роста и активность гидролитических ферментов в беспротеазных штаммах (МК-10, 2А-5) и исходном штамме (3-19) на различных субстратах. Рост клеток *B. pumilus*: исходный штамм 3-19 (1); штамм нокаутированный по гену *aprBp::erm* МК-10 (2), штамм нокаутированный по гену *gseBp::erm* 2А-5 (3). Активность ферментов в исследуемых штаммах: 3-19 (4); МК-10 (5), 2А-5 (6).

Полученные штаммы *B. pumilus* МК10 (*aprBp::erm*) и *B. pumilus* 2А-5 (*gseBp::erm*) могут быть рекомендованы для биотехнологических разработок в качестве штаммов-реципиентов для получения гетерологичных белков.

III. Разработка новой экспрессионной системы для получения гетерологичных белков в клетках *B. subtilis*. Известно, что присутствие в среде гликопептидных антибиотиков (например, бацитрацина, низина, ванкомицина и др.) нарушающих целостность клеточной мембраны, индуцирует в клетках бацилл работу четырёх сигнальных систем – альтернативного сигма фактора σ^M , и трёх двухкомпонентных систем (LiaRS, VceRS, YvcPQ) [Jordan S., et al., 2008]. Гены *liaIH*-оперона имеют наибольший уровень экспрессии. В отсутствии индуктора, например в логарифмической фазе роста, промотор этого оперона (P_{liaI}) является «молчащим» (не проявляет базальный уровень экспрессии). В условиях индукции антибиотиками, детергентами, органическими растворителями и др. веществами может достигаться 100- или 1000-кратное увеличение уровня экспрессии генов в течение 5-10 мин. Строгая регуляция данного промотора определяется функционированием ответного регулятора LiaR. На основе промотора *liaIH*-оперона нами сконструирована новая экспрессионная система (LIKE-система, от нем. Lia-Kontrollierte Expression) для получения рекомбинантных белков в клетках *B. subtilis*. Получены два типа плазмид, несущих индуцируемый промотор P_{liaI} (рис. 8).

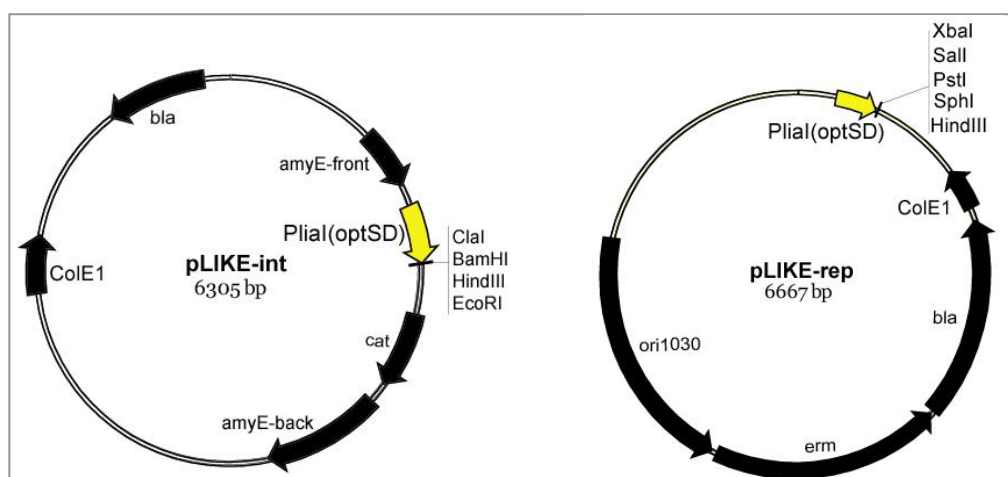


Рис. 8. Схема плазмид pLIKE-int и pLIKE-rep, несущих индуцируемый P_{liaI} промотор *B. subtilis*.

Сконструированные векторы различаются копийностью. Вектор pLIKE-int, при трансформации в клетки *B. subtilis*, позволяет интегрировать рекомбинантную конструкцию (промотор P_{liaI} + ген интересующего белка) в хромосому за счёт содержания в его составе участков гена амилазы (*amyE-back* и *amyE-front*). Эти участки ограничивают ген резистентности к антибиотику хлорамфениколу (*cat*) и индуцибельный P_{liaI} промотор. Вектор pLIKE-rep, реплицирующийся в клетках как плазмиды (шатл *E. coli/B. subtilis*), позволяет получить несколько копий ДНК на клетку. Длина регуляторного участка *liaIH* оперона (промотора, P_{liaI}) в составе обоих векторов составляет 156 п.о., включает LiaR ДНК-связывающую последовательность для индукции LiaRS-зависимых генов, -35...-10 область инициации транскрипции, SD область инициации трансляции. Для увеличения продукции интересующих белков провели

оптимизацию рибосом-связывающей области регуляторного участка *liaIH* оперона до канонической SD-последовательности (–taaggagg–), характерной для бациллярных генов (рис. 9).

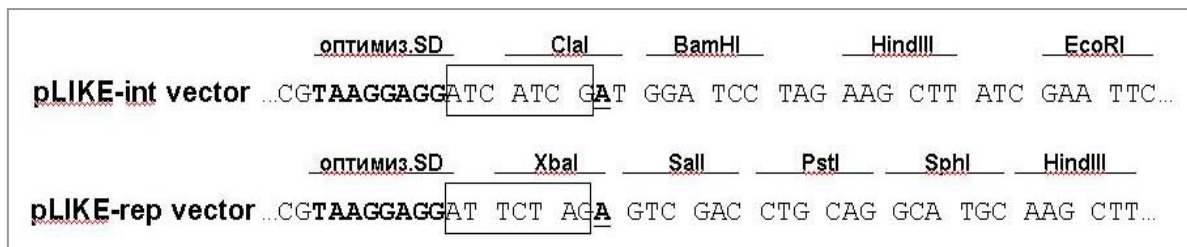
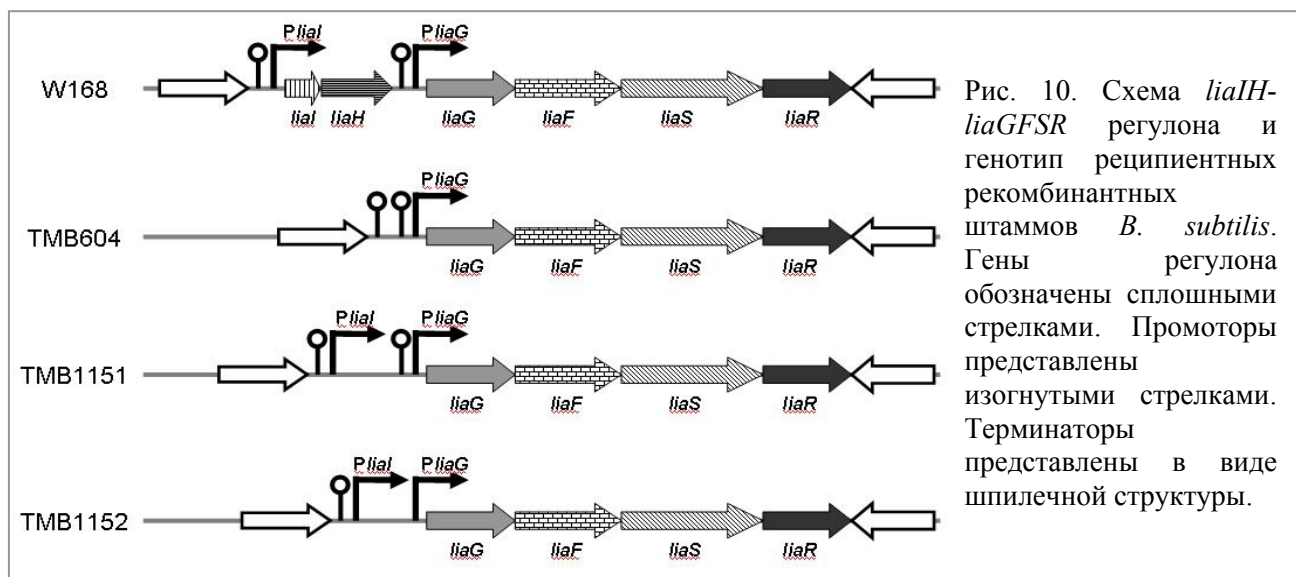


Рис. 9. Часть регуляторной последовательности *liaIH* оперона, входящей в состав разработанных экспрессионных векторов. $P_{liaI(optSD)}$ содержит оптимизированный канонический сайт Шайна-Дальгарно (выделен жирным шрифтом) и полилинкер. В рамку выделена область из 7 нуклеотидов, расположенных до стартового кодона ATG.

Получение рекомбинантных штаммов *B. subtilis* для усиления активности P_{liaI} промотора. На основе структурной организации *liaIH-liaGFSR* регулона и его функционирования предположили, что активация P_{liaI} промотора приводит к усилению экспрессии генов *liaGFSR* локуса, за счёт «проскакивания» РНК-полимеразы через терминатор [Mascher T., et al., 2004]. Тогда удаление терминатора будет способствовать усилению активности индуцируемого P_{liaI} промотора и позволит добиться повышенной продукции рекомбинантных белков. С другой стороны показано, что гиперпродукция LiaH белка в клетках приводит к снижению уровня трансляции (сокращение аминокислот и рибосом), что нежелательно для производства рекомбинантных белков. Основываясь на этих данных, мы получили коллекцию реципиентных рекомбинантных штаммов *B. subtilis*, предполагая, что дополнительные регуляторные области на хромосоме (промотор, ген и терминатор) будут влиять на экспрессию рекомбинантного гена в составе LIKE системы экспрессии и, в конечном счёте, на выход целевого продукта. Схема *liaIH-liaGFSR* регулона полученных рекомбинантных штаммов представлена на рисунке 10.



Характеристика новой LIKE-системы на основе экспрессии генов рекомбинантных белков. В качестве индуктора LIKE-системы экспрессии был выбран антибиотик бацитрацин. Бацитрацин оказывает наибольший индуцирующий эффект на P_{liaI} промотор в клетках *B. subtilis*, в тоже время, максимальный уровень активности промотора достигался при низких концентрациях этого антибиотика [Rietkötter E., et al., 2008]. В качестве репортёрного гена для изучения экспрессии в составе новой LIKE-системы выбрали ген *gfpmut1*. При сравнении активности $P_{liaI(optSD)}$ промотора в составе pLIKE-int и pLIKE-rep плазмид во всех исследуемых рекомбинантных штаммах наблюдали быстрое (в течение 30 мин) накопление флуоресценции после добавлении бацитрацина (30 мкг/мл) в среду культивирования (рис. 11 A/A1). Максимальный уровень активности $P_{liaI(optSD)}$ промотора наблюдали в штаммах содержащих репликативный pLIKE-rep вектор по сравнению со штаммами несущими в клетках одну хромосомную копию рекомбинантной конструкции (т.е. в составе pLIKE-int вектора) (рис. 11 B/B1).

Результат оптимизации рибосом-связывающего сайта наблюдали при сравнении продукции белка GFP в двух штаммах - W168 и TMB408, содержащих интегративную конструкцию - pLIKE-int+*gfp* (рис. 11 A/B). Показано, что оптимизация сайта Шайна-Дальгарно приводит к увеличению продукции белка в ~6 раз.

Делеция нативного P_{liaI} промотора на хромосоме штамма TMB604 приводила к снижению активности $P_{liaI(optSD)}$ промотора в составе экспрессионного интегративного вектора в 1,5 раза, а в составе репликативного – в 3 раза по сравнению со штаммом, имеющим генотип дикого типа (рис. 11 B/B1). Делеция элементов *liaH*-оперона, но сохранение нативного P_{liaI} промотора на хромосоме (TMB1151/1152), приводила к незначительному увеличению активности рекомбинантного $P_{liaI(optSD)}$ промотора (в 1,5 раза) при использовании pLIKE-int и pLIKE-rep векторов (рис. 11 B/B1).

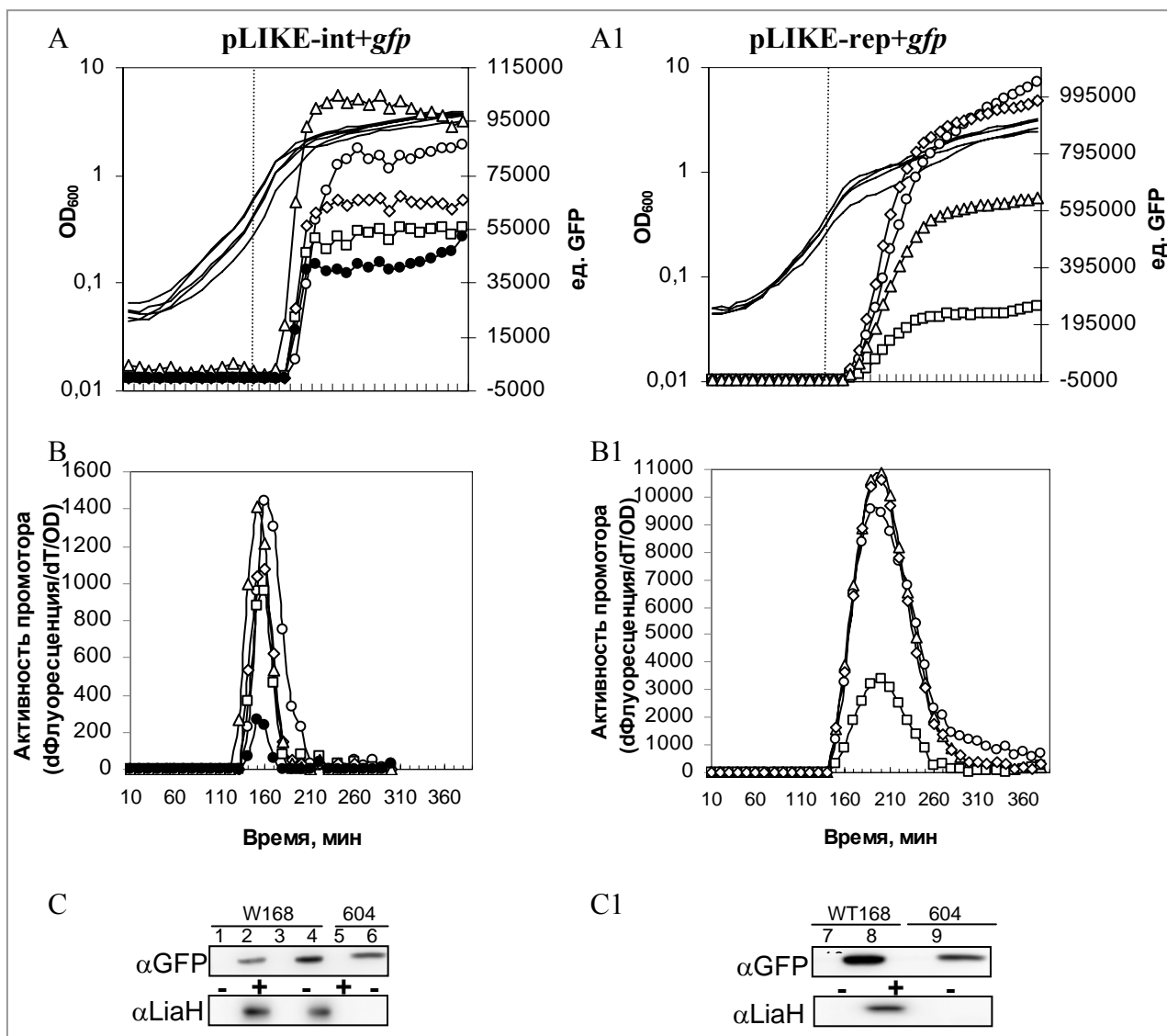


Рис. 11. Рост, показания флуоресценции (A/A1) и активность промотора (B/B1) в штаммах несущих трансляционные конструкции $P_{liaI(optSD)}-gfpmut1$. Кривые роста показаны без символов. Обозначения экспрессии в разных штаммах: (○) (W168), (□) (TMB604), (◇) (TMB1151), (Δ) (TMB1152) (●) (TMB408 $P_{liaI}-gfpmut1$). Вертикальной пунктирной линией показано время добавление индуктора ($OD_{600} \sim 0.4-0.5$, бацитрацин 30 мкг/мл). (C/C1) Western blot анализ цитоплазматической фракции клеток, содержащих полученные конструкции с использованием антител к белкам LiaH и GFP. Обозначения: 1,2 - экспрессия конструкций с нативного промотора P_{liaI} , 3-10 - экспрессия конструкций $P_{liaI(optSD)}$ в отсутствии (-) и присутствии (+) бацитрацина (концентрация 30 мкг/мл).

Для подтверждения полученных результатов, провели Western blot анализ с использованием антител к белку GFP и белку LiaH (рис. 11 C/C1). Показали, что оба белка не наблюдались в клетках до их индукции бацитрацином. Это свидетельствует о строгом контроле активности $P_{liaI(optSD)}$ промотора в клетках *B. subtilis*. После добавления антибиотика в среду белки GFP и LiaH накапливались в клетках в различной концентрации, что соответствовало генотипу полученных конструкций (рис. 10, рис. 11 C/C1).

Таким образом, нами разработан эффективный инструментальный – LIKE-система экспрессии *B. subtilis*, основанная на стресс индуцибельном промоторе *lialH*-оперона и ряд штаммов с делециями *lialH-liaGFSR* регулона на хромосоме. Разработанная система позволяет направленно экспрессировать интересующие гены как в составе плазмидного элемента – репликативная конструкция (pLIKE-ger), так и в составе генома клеток – интегративная конструкция (pLIKE-int). Показано, что в составе интегративной конструкции $P_{lial(optSD)}$ промотор становится активным уже через 20-30 мин, достигая максимума в течение часа после индукции. Напротив, в составе вектора pLIKE-ger промотор становится активным в течение часа, а пик активности фиксируется через 120 мин после индукции.

LIKE-система для продукции генов сериновых протеиназ. Для тестирования новой системы экспрессии бацилл использовали гены сериновых протеиназ *B. pumilis* 3-19. Известен потенциал этих ферментов в биотехнологии и медицине [Ицкович Е.Л. с соавт., 1998], что определяет необходимость получения чистого продукта в большом количестве. Гены глутамилэндопептидазы (*gseBp*) и субтилизиноподобной протеиназы (*aprBp*) клонировали в репликативный вектор pLIKE-ger под контроль $P_{lial(optSD)}$ промотора. Плазмидами pAT3804 и pAT3805 трансформировали беспротеазный штамм *B. subtilis* BG2036 и получили рекомбинантные штаммы TMB1246 и TMB1247 соответственно. Исследовали протеолитическую активность рекомбинантных штаммов на молочном агаре, и с применением специфических субстратов. Как видно из рисунка 12 (А), после 16 ч инкубирования рекомбинантных TMB1246, TMB1247 и нативного *B. pumilis* 3-19 штаммов на молочном агаре с добавлением бацитрацина, клетки рекомбинантных штаммов продуцировали протеиназы в среду эффективнее природного штамма.

Далее, с применением специфических субстратов исследовали активность протеиназ (AprBp, GseBp) в рекомбинантных штаммах (TMB1246 и TMB1247) по сравнению с нативным штаммом *B. pumilis* 3-19. Как видно из рисунка 12 В/С, после добавления индуктора (с интервалом в час) в культуральной жидкости штаммов TMB1246 и TMB1247 наблюдалась активность сериновых протеиназ. На 9 ч культивирования в штамме *B. subtilis* TMB1246 активность AprBp фермента увеличивалась в ~2,5 раза по сравнению с нативным штаммом *B. pumilis* 3-19. Активность глутамилэндопептидазы почти не обнаружена на протяжении с 6 по 9 часы культивирования у бактерий *B. pumilis* 3-19, однако обнаруживалась в штамме TMB1247 ($P_{lial(optSD)}+gseBp$). Таким образом, LIKE система эффективна в отношении экспрессии генов внеклеточных белков.

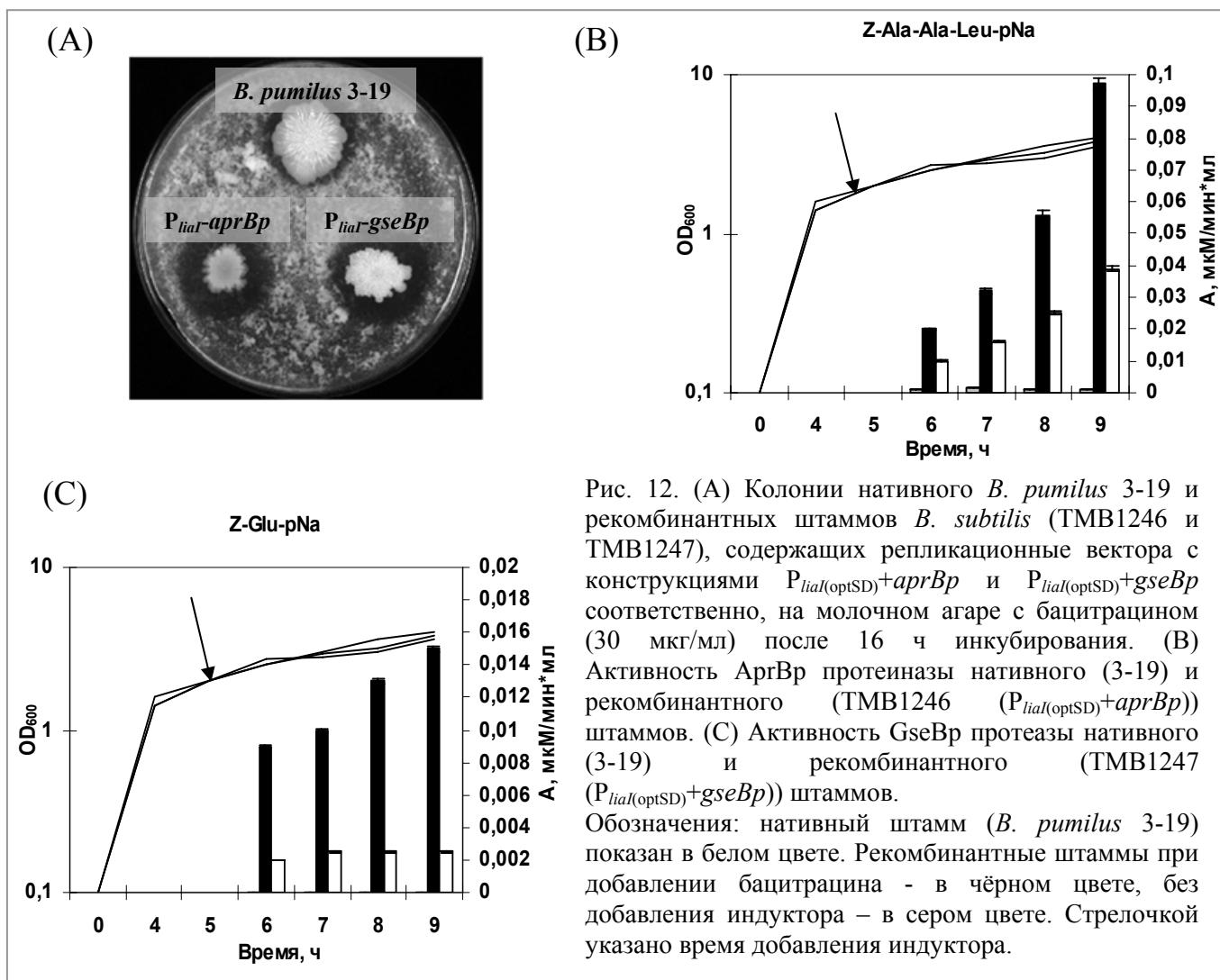


Рис. 12. (А) Колонии нативного *B. pumilus* 3-19 и рекомбинантных штаммов *B. subtilis* (ТМВ1246 и ТМВ1247), содержащих репликационные вектора с конструкциями $P_{lial(optSD)}+aprBp$ и $P_{lial(optSD)}+gseBp$ соответственно, на молочном агаре с бацитрацином (30 мкг/мл) после 16 ч инкубирования. (В) Активность AprBp протеиназы нативного (3-19) и рекомбинантного (ТМВ1246 ($P_{lial(optSD)}+aprBp$)) штаммов. (С) Активность GseBp протеазы нативного (3-19) и рекомбинантного (ТМВ1247 ($P_{lial(optSD)}+gseBp$)) штаммов.

Обозначения: нативный штамм (*B. pumilus* 3-19) показан в белом цвете. Рекомбинантные штаммы при добавлении бацитрацина - в чёрном цвете, без добавления индуктора - в сером цвете. Стрелочкой указано время добавления индуктора.

Итак, нами установлена протяженность промоторной области генов сериновых протеиназ *B. pumilus*; показано, что её размер коррелирует с количеством включенных сайтов регуляции, которые активизируются в определенную фазу развития культуры. Доминирующая протеиназа имеет более сложную регуляторную область гена по сравнению с регуляторной областью гена минорного фермента. С помощью гибридных конструкции установлена ведущая роль факторов DegU и Spo0A в активации исследуемых генов. Впервые показано, что инактивация протеолитических генов *B. pumilus* приводит к изменению морфологии клеток, их способности метаболизировать экзогенные сахара, задержке споруляции и снижению экзогенного пула протеолитических ферментов. Для гетерологичной экспрессии генов сериновых протеиназ впервые сконструирована новая стресс-индуцибельная LIKE экспрессионная система, основными характеристиками которой являются: (1) строго регулируемый промотор $P_{lial(optSD)}$ неактивный в экспоненциальной фазе роста, а также в отсутствии стимула; (2) индукция промотора происходит в течение 20-60 мин и может достигать 1000-кратного уровня; (3) оптимизация SD региона, следующего за промотором P_{lial} , позволяет повысить уровень рекомбинантного белка в составе LIKE системы в ~6 раз; (4) $P_{lial(optSD)}$ промотор эффективен для

экспрессии как внутриклеточных, так и внеклеточных генов белков; (5) для активации промотора может быть использован широкий спектр индукторов. Разработанная система экспрессии позволила получить рекомбинантные сериновые протеиназы *B. pumilus* в ранней стационарной фазе в количестве пригодном для анализа.

ВЫВОДЫ

1. Установлена регуляторная область генов протеиназ *Bacillus pumilus*, необходимая для полноценной экспрессии: для гена субтилизиноподобной протеиназы (*aprBp*), оптимальный промотор составляет 445 п.о.; для гена глутамилэндопептидазы (*gseBp*) - 150 п.о.
2. С помощью fusion-конструкций с репортёрным геном *gfp* показано, что факторы транскрипции DegU и Spo0A оказывают позитивное влияние на экспрессию генов протеиназ. Мутация по гену *sigD* повышает активность промотора гена *gseBp* в 1,5-2,5 раза и незначительно влияет на активность промотора *aprBp* протеиназы.
3. Инактивация генов протеолитических ферментов бацилл приводит к плейотропному эффекту: изменяется спектр внеклеточных гидролаз, частично морфология и биохимические характеристики.
4. Сконструирована новая LIKE-система экспрессии на основе антибиотико-индуцибельного промотора LiaRS двухкомпонентной системы *Bacillus subtilis*.
5. Новая LIKE экспрессионная система эффективна в отношении экспрессии генов внутриклеточного белка GFP и внеклеточных сериновых протеиназ.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Toymentseva A.A. The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *liaI* promoter / **А.А. Тойменцева**, K. Schrecke, M.R. Sharipova, T. Mascher // Microbial Cell Factories. -2012. -V.11. -No.1. -P.143. (перечень ВАК), автора – 0,84 п.л.
2. Шарипова М.Р. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 / М.Р. Шарипова, **А.А. Тойменцева**, А.Р. Сабирова, А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // Микробиология. -2011. -Т. 80. -№ 3. -С. 424-426. (перечень ВАК) автора – 0,05 п.л.
3. Тойменцева А.А. *Bacillus intermedius* с нокаутированным геном субтилизиноподобной протеиназы / **А.А. Тойменцева**, М.Р. Каримова, А.А. Ризванов, Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарапова // Учен. Зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010. -Т. 152, кн. 4. -С. 143-155. (перечень ВАК), автора – 0,5 п.л.
4. Тойменцева А.А. Влияние делений в промоторе на экспрессию гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedins* / **А.А. Тойменцева**, Е.И. Шагимарданова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010.-Т. 152. кн. 3. -С. 149-158. (перечень ВАК), автора – 0,5 п.л.

5. Черёмин А.М. Выделение регуляторных белков, активирующихся в условиях ограниченного роста бацилл / А.М. Черёмин, **А.А. Тойменцева**, А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, А.Б. Маргулис, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. -2010. -Т. 152. кн. 4. -С. 156-168. (перечень ВАК), автора – 0,27 п.л.

Другие публикации по теме диссертации:

6. Нямсурэн Ч. Модификация бактериальной системы экспрессии на основе подбора сигнального пептида / Ч. Нямсурэн, **А.А. Тойменцева** // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ-2012». - Москва, 2012. –С.161.

7. Тойменцева А.А. Регуляция экспрессии генов протеаз *Bacillus pumilus* на основе репортёрной конструкции / **А.А. Тойменцева**, М.Р. Шарипова // XI Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» - Казань, -2012. –С.67.

8. Нямсурэн Ч. Конструирование системы экспрессии для *B. subtilis* на основе *lia*-промотора / Ч. Нямсурэн, **А.А. Тойменцева**, М.Р. Шарипова // XI Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». –Казань, 2012. –С.51.

9. Нямсурэн Ч. Экспрессия fusion-конструкции на основе гена бетта-галактозидазы под промотором гена глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* / Ч. Нямсурэн, **А.А. Тойменцева**, М.Р. Шарипова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского (Приволжского) федерального университета. -Казань, 2011. –С.15-16.

10. Гончарова А.В. Экспрессия fusion-конструкции под контролем промотора гена субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* 3-19 в регуляторных мутантах / А.В. Гончарова, О.Н. Игонина, **А.А. Тойменцева**, М.Р. Шарипова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского (Приволжского) федерального университета. -Казань, 2011. –С.6-7.

11. Nyamsuren C. Study of the Impact of Major Transcription Factors on Gene Expression of Serine Proteases from *Bacillus pumilus* 3-19 by Using Fusion-Design / C. Nyamsuren, O. Igonina, A. Goncharova, **A. Toymentseva**, M. Sharipova // Students, Masters and PhD Students III Annual International Scientific Conference in Biology. Ivane Javakhishvili Tbilisi State University. –Tbilisi, Georgia, 2011. -P.69-70.

12. Тойменцева А.А. Влияние факторов транскрипции на экспрессию генов сериновых протеаз *Bacillus pumilus* 3-19 / Ч. Нямсурэн, О.Н. Игонина, А.В. Гончарова, **А.А. Тойменцева**, Е.И. Шагимарданова, М.Р. Шарипова // X Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета. Казань, 2011. – С.77.

13. Тойменцева А.А. Филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 / **А.А. Тойменцева**, А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р.

Шарипова // Сборник тезисов Российской школы для молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань, 2010. –С.59.

14. Toymentseva A.A. The Expression of *aprBi* and *gseBi* genes under Control of different DNA-binding Proteins in *Bacillus intermedius* / A. Toymentseva, M. Sharipova, T. Mascher // "3rd Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)". -Hannover, Germany, 2009. -P.121.

15. Cheryomin A.M. The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from cells lysate of the *Escherichia coli* / A.M. Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymentseva, N. Pina, M.R. Sharipova // Materials of IV Russian symposium called "Protein and Peptides". –Kazan, 2009. -P.310.

16. Cheryomin A.M. The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from the *Escherichia coli* recombinant strains / A.M. Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymentseva, N. Pina, M.R. Sharipova // 14th international conference "Microbial enzymes in biotechnology and medicine". -Kazan, 2009. -P.72.

17. Cheryomin A.M. The purification of *Bacillus subtilis* DegU and Spo0A regulatory proteins from the *Escherichia coli* recombinant strains / A.M. Cheryomin, A.R. Kayumov, A.A. Toymentseva, N. Pina, M.R. Sharipova // XIV international conference "Microbial enzymes in biotechnology and medicine" devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. -Kazan, 2009. -P.12.

18. Toymentseva A.A. Inactivation of serine proteinase genes from *Bacillus intermedius* / A.A. Toymentseva, A.A. Akhmetova, M.R. Karimova, A.R. Kayumov, A.A. Rizvanov, M.R. Sharipova // XIV international conference "Microbial enzymes in biotechnology and medicine" devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. -Kazan, 2009. -P.65.

19. Sharipova M.R. The role of microbial proteinases in stress response of Gram-positive bacteria: from signaling to regulatory networks / M.R. Sharipova, A.A. Toymentseva, A.R. Kayumov, A.A. Rizvanov, E.I. Shagimardanova // XIV international conference "Microbial enzymes in biotechnology and medicine" devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. -Kazan, 2009. -P.58.

20. Toymentseva A.A. Genetic modification of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene promoter / A.I. Akhmetova, A.A. Toymentseva, A.R. Kayumov, M.R. Sharipova // XIV international conference "microbial enzymes in biotechnology and medicine" devoted to the 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Justus-Liebig Giessen University. –Kazan, 2009. -P.18.

21. Sharipova M.R. Characteristic of functional regulation activity and proteases' genes expression in stress conditions of bacillus / M.R. Sharipova, A.A. Toymentseva, A.R. Kayumov, A.R. Sabirova, N.L. Rudakova, N.P. Balaban // Materials of IV Russian symposium called "Protein and Peptides". –Kazan, 2009. -P.96.

22. Akhmetova A.I. Identification promoter area of *gseBi* required for potential expression of this enzyme / A.I. Akhmetova, A.A. Toymentseva, A.R. Kayumov,

M.R. Sharipova // Materials of IV Russian symposium called "Protein and Peptides". - Kazan, 2009. -P.329.

23. Karimova M.R. Construction genes of glutamyl endopeptidase *Bacillus intermedius* with deletion in the regulation of area and analysis their expression in *Bacillus subtilis* cells / M.R. Karimova, **A.A. Toymentseva** // Materials of XLVI international scientific conference of students "Scientific-and-technological advance". –Novosibirsk, 2008. -P.38-39.

24. Тойменцева А.А. Экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, модифицированного в области промотора в клетках *Bacillus subtilis* / **А.А. Тойменцева**, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «ЛОМОНОСОВ-2008». – Москва, 2008.

25. Toymentseva A.A. Specificity of an expression of the modified genes *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* cells / **A.A. Toymentseva**, M.R. Karimova, M.R. Sharipova // International scientific and technical conference "SCIENCE AND EDUCATION-2008". –Murmansk, 2008. -P.585-586.

26. Тойменцева А.А. Экспрессия гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* модифицированного в области промотора в клетках *Bacillus subtilis* / **А.А. Тойменцева**, М.Р. Каримова, Е.И. Шагиморданова, М.Р. Шарипова // Материалы докладов XIV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» Международный молодёжный научный форум «Ломоносов -2007». -Москва, 2007. –С.45.

27. Шагиморданова Е.И. Получение гена глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* с модифицированной областью регуляции и изучение его экспрессии в клетках *Bacillus subtilis* / Е.И. Шагиморданова, **А.А. Тойменцева**, М.Р. Каримова, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов и стендовых сообщений VI симпозиума «Химия портеолитических ферментов». –Москва, 2007.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. профессору М.Р. Шариповой за внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; к.б.н., доц. А.М. Мардановой и к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан за постоянные консультации и обсуждение результатов; профессору Т. Masher за сотрудничество по созданию новой антибиотико-индуцибельной системы и предоставление для работы лабораторных штаммов и плазмид, а также за возможность проведения части экспериментов в лаборатории Мюнхенского университета Людвига-Максимилиана (LMU, Германия). Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета, профессору О.Н. Ильинской и сотрудникам кафедры микробиологии за помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аттестации, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне и по факсу: (843) 238-76-01